Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Biotin-Avidin auf die Fettsäuresynthese in Vitro

Christian Villinger

1962

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von Biotin-Avidin auf die Fettsäuresynthese in Vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christian Villinger
aus Marburg an der Lahn

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. SEITZ
Dekan: Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 10.7.1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MEINEM VATER

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0008

INHALTSANGABE

		Seite
1. Einleitung		
	Fettsäuresynthese	7
	Biotin	9
	Avidin	12
2. Problemstellung		13
3. Experimenteller Teil		14
	Darstellung des verwendeten Enzym-Systems	14
	Inkubation	15
	Darstellung von C^{14} markierten Fettsäuren und C^{14} markiertem Cholesterin	16
	Bestimmung der Radioaktivität der höheren Fettsäuren	16
	Darstellung und Bestimmung der Radioaktivität des Cholesterins	16
	ATP-Ferment-Test	17
4. Ergebnisse		20
5. Diskussion		33
6. Zusammenfassung		38
7. Literatur		41
8. Lebenslauf		44

Fettsäuresynthese

Der Säugetierorganismus kann Fett außer aus Fettsäuren auch aus anderen Stoffen aufbauen, dies wird durch die Mast von Haustieren eindeutig bewiesen. Dabei setzt der Organismus durch reichliche Kohlenhydrat- oder Eiweißkost Fett an (1, 2).

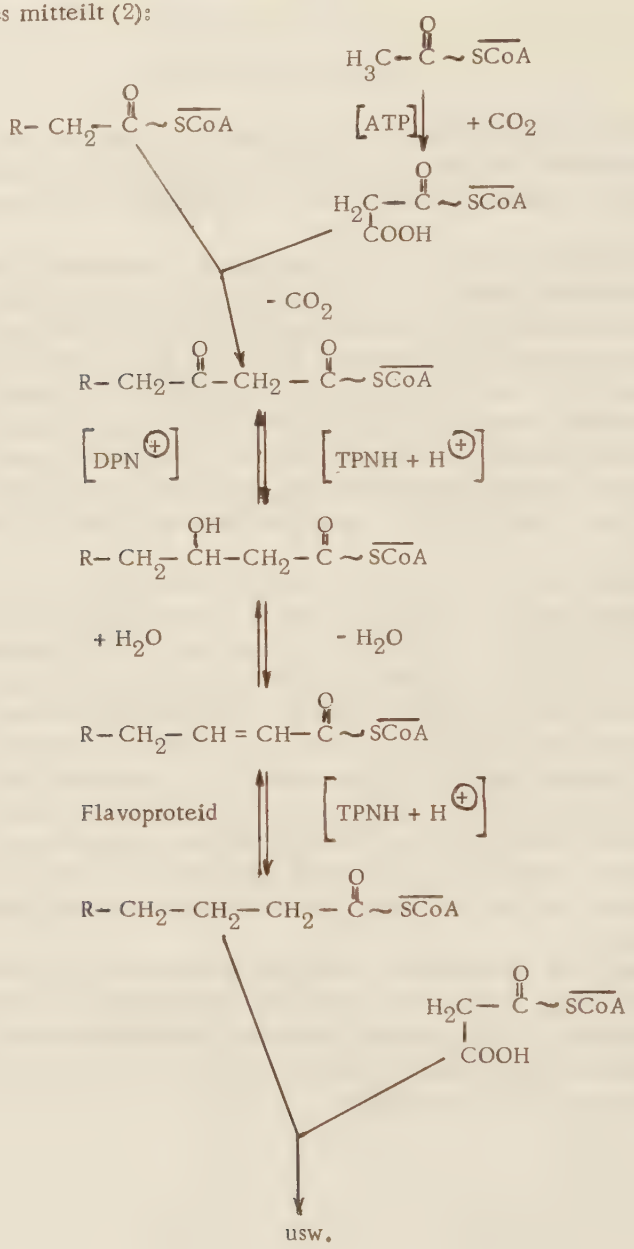
Die Biosynthese der Fettsäuren benutzt als Ausgangsprodukt nach den heutigen Erkenntnissen vornehmlich das Acetyl-CoA (3 und 4, 5). Dieses Acetyl-CoA ist gleichzeitig wichtigstes Zwischenprodukt auch des Kohlenhydratstoffwechsels. Da alle Reaktionen der ß-Oxydation, also des Fettsäureabbaues, reversibel sind, nahm man bis vor kurzem an, daß die Abbaureaktionen bei einem Überangebot von reduzierten Coenzymen und bei genügender Zufuhr von Adenosintriphosphat bzw. Acetyl-thioester, als Energielieferanten, rückwärts ablaufen würden: jetzt also im Sinne einer Synthese von höheren Fettsäuren. Jedoch macht der Organismus von dieser Möglichkeit nicht oder jedenfalls nur in sehr beschränktem Maße Gebrauch.

LYNEN fand, daß Acetyl-CoA unter der Einwirkung eines spezifischen, biotinhaltigen Enzyms, der ß-Methyl-crotonyl-CoA-carboxylase, CO_2 anlagert zu Malonyl-CoA (6). Diese Reaktion ist endergonisch. Es wird Energie in Form von ATP für sie benötigt. Sie dürfte über das "aktive Carboxyl", das Carboxy-biotin, verlaufen. In dem entstandenen Malonyl-CoA existiert eine besonders aktive CH_2-Gruppe, die nun leicht mit Acyl-CoA (Acetyl-CoA oder auch höheren aktivierten Fettsäuren) reagiert. Dabei entsteht die ß-Ketosäure unter CO_2-Abspaltung.

Die weiteren Schritte laufen dann im wesentlichen als Umkehrung der ß-Oxydation ab. Jedoch geschieht die Reduktion der ß-Ketosäure und des ungesättigten Acyl-CoA-Derivates zur gesättigten Verbindung nicht durch das Einwirken eines Flavoproteins, sondern durch eine TPNH-abhängige, komplexe Reaktion an einem Ferment (2).

Dieser eben beschriebene Vorgang der Kondensation mit Malonyl-CoA zur ß-Ketoverbindung und deren Reduktion kann sich desweiteren immer wiederholen, so daß auf diese Weise die höheren Fettsäuren synthetisiert werden. Allerdings endet im Säugetierorganismus der Aufbau aus bisher noch nicht geklärter Ursache bei den C_{16} und C_{18}-Verbindungen.

Das folgende Schema soll die Ausführungen in den einzelnen Schritten darstellen, wie KARLSON es mitteilt (2):

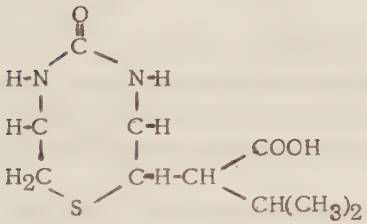


Biotin

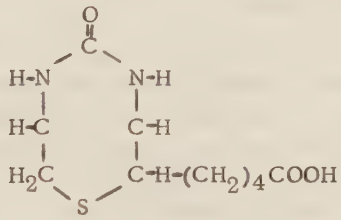
Die Geschichte des Biotins, des Vitamin H, beginnt im Jahre 1927, als Miss BOAS-FIXSEN erstmalig auf das Biotin unter dem von ihr gegebenen Namen "Faktor X" aufmerksam machte (7). GYÖRGY erkannte 1931 diesen "Faktor X" als einen für den Menschen unentbehrlichen Diätbestandteil und nannte ihn wegen seiner Wirkung auf Beschaffenheit und Funktion der Haut "Haut-Faktor" (8). Bis zur Isolierung aus dem Eigelb dauerte es dann bis 1936, was KÖGL und TÖNNIS zu danken ist (9, 10), die auf der Suche nach den sogenannten "Bios-Faktoren" waren. Diese mühseligen Versuche erbrachten aus 250 kg getrocknetem, chinesischen Eidotter 1,1 mg Biotin. 1940 gelang es DU VIGNEAUD, GYÖRGY und Mitarbeitern einen zweiten in seinen chemischen Eigenschaften etwas verschiedenen Stoff, und zwar aus der Leber darzustellen. Diese beiden Biotin-Formen werden als α-Biotin (aus Eigelb) und ß-Biotin (aus der Leber) unterschieden.

DU VIGNEAUD und seine Mitarbeiter und KÖGL und dessen Mitarbeiter erhellten 1942 durch Abbaureaktionen und darauffolgende Synthesen die chemische Struktur sowohl des aus Eigelb als auch des aus Leber gewonnenen (α- und ß-Biotin) Biotins (11 und 8). Die auf die Abbaureaktionen erfolgenden Synthesen des Biotins sind Verdienste FOLKERS und seiner Mitarbeiter (12, 13)

α-Biotin (Eigelb)



ß-Biotin (Leber)



Chemisch stellt das Biotin eine Kondensation von zwei Fünferringen, die in der Natur einmalig ist, einem Imidazol-Ring und einem Thiophen-Ring dar. Als Seitenkette präsentiert sich beim α-Biotin die Iso-valeriansäure und beim ß-Biotin die Valeriansäure. Die Biotine sind wasserlöslich. Sie sind Säuren, die Schwefel und Stickstoff enthalten. Sie bilden kristallisierende Methylester.

Biotin ist ein äußerst weitverbreiteter Stoff. Das Vorkommen erstreckt sich fast allgemein von Bakterien über Pflanzen bis hin zu den Organen höherer Tiere, wo es aber offenbar nicht synthetisiert werden kann. Auf Eigelb und Leber wurde

schon besonders aufmerksam gemacht. Doch muß noch auf die Hefe hingewiesen werden, für die es zu einem Komplex von Wuchsstoffen, dem sogenannten "Bios" gehört (8). Von diesem komplexen Wachstumsfaktor leitet sich der Name "Biotin" ab. Ein großer Teil des Biotins ist im übrigen in den Zellen nicht in freier Form vorhanden, sondern an Eiweiß gebunden, worauf in dem Abschnitt über das Avidin näher eingegangen wird. Im pflanzlichen Gewebe tritt Stärke an die Stelle des Eiweißes.

Der Bedarf an Biotin ist sehr schwer anzugeben. Für Ratten wird ein Quantum von täglich 1 Gamma gefordert, doch bestehen bei diesen Angaben Unsicherheiten, da die Mikroorganismen im Darm der Tiere in der Lage sind, zum Teil selbst Biotin zu synthetisieren. Beim Menschen gingen Mangelsymptome nach vorausgegangener Biotin-freier Ernährung durch Injektion von 75-300 Gamma pro die schnell zurück (1). STEPP, SCHRÖDER, KÜHNAU schätzen den Bedarf des menschlichen Organismus auf täglich 0,25 mg (14).

Eine Hypovitaminose bei Biotinmangelzuständen äußert sich, wie Ernährungsversuche Freiwilliger deutlich machten, in seborrhoischen Zuständen: übermäßige Absonderung der Talgdrüsen der Haut - was wohl durch eine Fehlleistung des Fett- und Eiweiß-Stoffwechsels bedingt ist -, Schuppung der Haut, dann graue Verfärbung und Dermatitis, bei noch schwereren Zuständen: Appetitlosigkeit, Müdigkeit, Muskelschmerzen, Hyperästhesien und elektrokardiographischen Veränderungen.

Die Bedeutung des Biotins im Stoffwechselgeschehen ist erst kürzlich und zwar durch Versuche Lynens und seiner Mitarbeiter weitgehend aufgeklärt worden. Bislang war von einer Reihe von Reaktionen nur bekannt, daß sie bei Biotinmangel verlangsamt ablaufen, was vermuten ließ, daß eine Abhängigkeit direkt oder indirekt vom Biotin besteht.

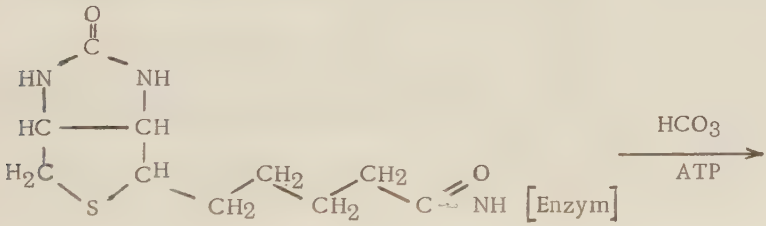
Unter dem Einfluß von Biotin laufen verschiedene reversible Carboxylierungsvorgänge ab. So die Bildung von Asparaginsäure über das Oxalacetat aus der Brenztraubensäure (17, 18, 19). Ferner wird die Wirksamkeit des "malic encyme" von Ochoa und der Oxalacetatdecarboxylase von Utter und Kurahashi, die für die Fixierung des Kohlendioxydes im Krebs'schen Citronensäurezyklus vorhanden sein müssen, ohne Biotin herabgesetzt (20, 21). Weiter gab Lardy die Einschränkung des Abbaues der Isovaleriansäure zur Acetessigsäure bei Biotin-Mangel bekannt (22). Lardy machte auch noch auf den Vorgang der Carboxylierung bei Oxydation der Propionsäure unter Biotin-Einfluß aufmerksam (23). Am Rande sei noch auf eine weitere Lardy'sche Arbeit verwiesen, in der er zeigt, daß Leber avitaminotischer Ratten kaum noch in der Lage sind, Ornithin (unter CO_2 und NH_3-Aufnahme) in Citrullin zu überführen (24, 25). Zur Abrundung der vielfältigen Biotinaufgabendarstellung seien endlich Arbeiten Mac Leods und Lardys und auch die von Moat, Wilkins und Friedmann zitiert, die über die mangelnde

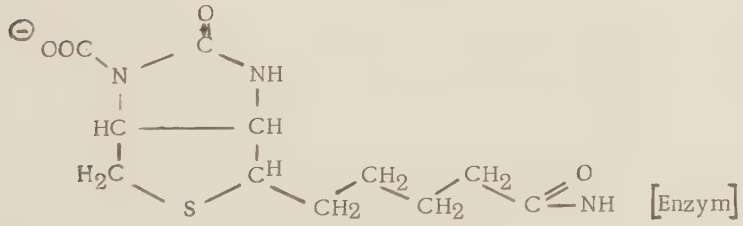
CO_2-Verwertung in der Purinsynthese bei Biotin-Mangel berichten (26, 27).

Biotin ist zum Aufbau der Wirkungsgruppe von Enzymen genau so wichtig wie fast alle wasserlöslichen Vitamine. Dieses biologische Prinzip (28) schließt in seiner Gültigkeit die folgenden Vitamine mit ein: Nicotinsäureamid, Thiamin, Pyridoxin, Panthotensäure, p-Aminobenzoesäure bzw. Folsäure.

Lynen und seine Mitarbeiter fanden, daß das Enzym ß-Methyl-Crotonyl-CoA-Carboxylase Biotin enthält und daß das Vitamin H, das Biotin, mit der Wirkgruppe dieses Enzyms identisch ist. Lynen konnte nachweisen, daß bei dem Vorgang der Carboxylierung intermediär aktives CO_2 in Form einer CO_2-Biotin-Enzym-Verbindung entsteht. Lynen nimmt an, daß es viele Biotinenzyme gibt, wie es viele Flavin-Enzyme gibt. So wie die Wirkungsgruppe Flavin in den Flavin-Enzymen ausnahmslos durch die reversible Oxydoreduktion Wasserstoff überträgt, so ist nach seiner Meinung zu erwarten, daß die Wirkungsgruppe Biotin in den verschiedenen Biotin-Enzymen durch die reversible Aufnahme und Abgabe von CO_2 Kohlensäure überträgt.

Das Biotin ist durch Hauptvalenzen an die Enzymproteine gebunden, stellt also eine prosthetische Gruppe dar. Die Beladung mit Kohlensäure ist eine endergonische Reaktion, die nur durch Zuhilfenahme des energieliefernden ATP ablaufen kann (29). Das am Stickstoff des Biotins gebundene CO_2 ist die aktive Form des Kohlendioxydes, die bei den zahlreichen Carboxylierungsreaktionen (eben zum Beispiel von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA) eingreift. Lynen und seinen Mitarbeitern gelang es, das sehr labile freie Carboxy-biotin in Form des Dimethylesters der CO_2 Biotin-Verbindung zu isolieren





Nach dieser Einführung in die biochemische Funktion des Biotins sei noch besonders deutlich auf die Arbeit von Wakil, Titchener und Gibson hingewiesen, die ebenfalls auf die Wichtigkeit des Biotins bei dem Carboxylierungsvorgang, wie er bei der Synthese höherer Fettsäuren aus aktivierterter Essigsäure abläuft, aufmerksam machen (30). Das für ihre Versuche benötigte Fermentsystem gewannen Wakil und seine Mitarbeiter aus Vogelleber . Bicarbonat war für den Ablauf der Reaktion erforderlich. Diese Arbeit wurde deshalb so besonders beachtet, weil die hier vorliegenden Versuche ebenfalls über den Einfluß von Biotin (und Avidin) auf die Fettsäuresynthese berichten.

Avidin

Die interessanteste der gebundenen Biotinformen ist die Verankerung mit einem Protein des Eiklars: dem Avidin . Avidin wurde erst kürzlich isoliert und erwies sich als ein Protamin von basischem Charakter mit einem hohen Kohlenhydratgehalt. Das Molekulargewicht wird zwischen 43 500 und 70 000 angegeben. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH Wert von 10 (31).

Lynen und Mitarbeiter nehmen an, daß das Biotin sich amidartig mit der Carboxylgruppe am Avidin verbindet und zwar im Verhältnis 1 : 1 (6). Diese Bindung wird der Avidin-Biotin-Komplex genannt. Der inaktive Komplex läßt sich im Magen-Darm-Trakt durch die proteolytischen Fermente nicht spalten. Auf welche Art und Weise der sehr feste Avidin-Biotin-Komplex im Gewebe gespalten wird,und es damit zur Wirkung des Vitamins kommen kann, ist bislang ungeklärt. In vitro läßt sich der Avidin-Biotin-Komplex relativ leicht durch Erwärmen bei 100°C über etwa 30 - 60 Minuten hinweg spalten.

Die Biotinacitaminose kommt dadurch zustande, daß bei Verfütterung von rohem Hühnereiweiß das im Eiklar enthaltene Avidin Biotin in dem oben angegebenen Verhältnis fest bindet. Durch Kochen von Hühnereiweiß verliert das Avidin seine Fähigkeit, Biotin zu binden.

Über die physiologische Bedeutung von Avidin ist bislang nichts bekannt.

PROBLEMSTELLUNG

Bei der Suche nach Stoffen, die die Fettsäuresynthese in hemmendem Sinne beeinflussen -eventuell auch für klinische Zwecke ausnutzbar-, stießen wir auf das im Hühnereiweiß physiologisch vorkommende Avidin, mit dem zunächst in vitro-Vorversuche unternommen wurden, die starke Hemmung der Synthese zeigten.

Versuche jedoch ohne das in vivo mit dem Avidin zum Avidin-Biotin-Komplex verankerte Biotin erschienen zu wenig weit, da für Erklärungsversuche nicht ausreichend. Dies um so mehr, da gerade Lynen und seine Mitarbeiter auf die eminent wichtige Funktion des Biotin als Coferment bei den intermediär erfolgenden Carboxylierungsvorgängen hingewiesen hatten.

Durch zusätzliche Untersuchungen über den Einfluß von Coenzym A, ATP und von CO_2, der Bestimmung des Adenosintriphosphats während der Synthese und die Höhe der Cholesterinsynthese in der Leber erhofften wir uns weitere Einblicke in die biochemischen Funktionen des Avidin-Biotin-Komplexes.

Für diese Experimente verwandten wir eine Fermentpräparation aus Taubenleber, mit deren Hilfe aus eingesetztem C^{14}-Natriumacetat als Substrat höhere markierte Fettsäuren hauptsächlich von einer Kettenlänge C_{16}-C_{18} -wie frühere Versuche ergaben- synthetisiert werden können. Wir folgten Angaben von Brady und Gurin, die inzwischen von v.Brand und Helmreich modifiziert wurden.
An dieser Stelle sei nochmals auf die Arbeit von Wakil, Titchener und Gibson aufmerksam gemacht, die ebenfalls aus Bogelleber gewonnenes Enzymsystem für ihre Untersuchungen ganz speziell über die Hemmung der Fettsäuresynthese durch Avidin und ihre Aufhebung durch Biotin verwandten. Ihre Arbeit wird in der Diskussion weiterhin zitiert werden. Die Aufgabe dieser Arbeit besteht darin, experimentell den Einfluß von Avidin und Biotin bzw. Avidin + Biotin auf die Fettsäuresynthese in der Taubenleber zu prüfen, was durch zusätzliche Experimente mit Coenzym A und CO_2, die ATP-Ferment-Teste und die Cholesterinsynthesefähigkeit erweitert werden soll und damit die Möglichkeit einer Erklärung der erzielten Ergebnisse bieten kann.

EXPERIMENTELLER TEIL

Für die Synthese von höheren Fettsäuren aus Acetat verwendeten wir ein aus Taubenleber gewonnenes lösliches Enzymsystem. Wir stellten dieses Enzymsystem deshalb aus Taubenleber dar, da Taubenleber noch am ehesten der Forderung nach besonders hoher Wirksamkeit seiner Fermente entspricht. Im Mittel werden annähernd 15 % des eingesetzten C^{14}-Natriumacetates zu höheren Fettsäuren und Cholesterin synthetisiert, wohingegen die vergleichsweise sehr viel größere Schweineleber oder die wesentlich billigere Rattenleber nur etwa 5 % Synthesefähigkeit zeitigt. Um diese 15 % höhere Wirksamkeit in der Fettsäure- und Cholesterinsynthese auch möglichst immer zu erreichen, verwendeten wir junge, gesunde - soweit sich das bei der makroskopischen Betrachtung der Leber feststellen läßt - bis zu sechs Monate alte Tauben, die vorher reichlich mit Kohlenhydraten (Weizenkörner) gefüttert worden waren. Die Fütterung ist deshalb von ausschlaggebender Wichtigkeit, da Versuche von von Brand und Helmreich mit einem Enzymsystem aus der Leber von Tauben, die 72 Stunden gehungert hatten, eine vergleichsweise sehr geringe Ausbeute an höheren Fettsäuren erzielten (32). In den Grundzügen folgen wir damit Angaben von Brady und Gurin (33).

Verwendete Reagentien

Natriumacetat (Carb-oxyl-C^{14})
Harwell Radiochemical Centre, England

(+) Biotin
Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzach

Avidin
Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Alle anderen Präparate sind p.a.Präparate der
Firma Merck, Darmstadt.

Darstellung des verwendeten Enzymsystems

Wir dekapitierten je nach Anzahl der Versuchsansätze und der sich ergebenden Leberausbeute 3 -5 Tauben. Nach der sofortigen Entnahme wird die Leber zum Schutz der Fermente in aqua destillata von $0^{o}C$ gelegt. Es folgt die Entfernung des etwa anhaftenden - die Synthesefähigkeit stark schmälernden - Bindegewebes. Die auf Filterpapier getrocknete Leber wird grob zerkleinert und gewogen, wobei alle diese aufgeführten Arbeitsgänge bei einer Temperatur von $0^{o}C$ (Eisbad) ausgeführt werden.

Für die Darstellung eines zellfreien Enzymsystems - supernatant fluid = "sup" - wird der abgewogenen Lebermenge im Verhältnis 1 : 1,5 ein Puffergemisch zugesetzt, das sich aus folgenden Teilen zusammensetzt: 11,876 g $NaHPO_4$, 9,0 g KH_2PO_4, 7,0 g $KHCO_3$ auf 1000 ml aqua bidest (34). Ein

Gramm Leber entspricht 0,8 ml. Dieses Gemisch wird nun im "Potter-Elvehjem-Handhomogenisator" mäßig schnell, aber ausreichend homogenisiert, was zu einer weitgehenden Zerstörung der Zellwände führt.

Das auf diese Weise gewonnene Homogenat wird in den folgenden 45 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 2000 U/min im Eisschrank zentrifugiert. Der Satz des Zentrifugates, aus Zellbestandteilen bestehend, wird verworfen. Der Überstand wird mit der schon vorher verwandten Pufferlösung so verdünnt, daß 4 ml einer Anfangsmenge von 3 g Leber entsprechen. Diese Lösung wird nun abermals, diesmal jedoch bei einer Umdrehungszahl von 25000 U/min und 75 Minuten lang geschleudert. Der danach gewonnene Überstand ist der supernatant fluid = "sup", der von Zellbestandteilen frei, jedoch noch Mikrosomen und Mitochondrien enthält, die nur durch eine Ultrazentrifuge mit über 100 000 U/min abzuzentrifugieren wären, wie das Brady und Gurin angeben, deren Methode wir sonst weitgehend folgen. Diese Ultrazentrifuge stand uns jedoch zu unserem Bedauern nicht zur Verfügung.

Der Eiweißgehalt dieses supernatant fluid beträgt im Mittel 35,5 mg $\pm$ 2 mg für die pro Versuchsansatz verwendete Enzymmenge, wie von Brand und Helmreich angeben.

Inkubation

Die eigentliche in vitro-Fettsäuresynthese erfolgt im "Warburg-Apparat". Dazu wird das in der angegebenen Weise präparierte Enzymsystem mit verschiedenen Reagentien in geeichte Warburg-Tröge gebracht und vier Stunden lang bei 38°C $\pm$ 0,1°C im Warburg-Apparat schüttelnd bebrütet. Als stets gleichbleibender Zusatz wurde $MgCl_2$ in der optimalen Konzentration von 6×10^{-3}mg, wie frühere Versuche zeigten, wegen der aktivierenden Wirkung auf das Fermentsystem verwandt (34). Ebenfalls wurde 0,01 mg Na-Citrat in 0,1 ml dazugegeben, da ohne Zugabe von Citrat der Einbau von C^{14}-Acetat in höhere Fettsäuren und Cholesterin nicht vonstatten geht.

Jeder einzelne Ansatz von 3 ml Gesamtvolumen mit einem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 (der während der Inkubation konstant erhalten wird) beinhaltet also folgendes:

0,1 ml $MgCl_2$	0,0086 m Endkonzentration
0,1 ml Na-Citrat	0,01 m Endkonzentration
0,4 ml Akt. Acetat	0,008 m Endkonzentration
2,3 ml Enzymsystem	
0,1 ml andere Zusätze zum Beispiel Puffer	

Die Gasphase ist während der Inkubation aerob.

Die Versuche mit CO_2-Begasung wurden in der Weise angestellt, daß die Warburg-Kölbchen etwa 10 Minuten lang mit sauerstoffreier Kohlensäure durchspült und die Gefäße anschließend dicht verschlossen wurden, um das Milieu zu wahren.

Darstellung der C^{14} markierten Fettsäuren und des C^{14} Cholesterins.

Nach der dreistündigen Inkubarion werden die C^{14}-Acetat-enthaltenden Versuchsansätze nach der Methodik von Brady und Gurin aufgearbeitet, in dem die Ansätze aus den Warburg-Trögen mit 7 ml aqua bidest. in ein birnenförmi-ä ges Schliffkölbchen übergespült und nach Zugabe von 5 ml 30 %iger alkoholischer KOH und 25 mg Palmitinsäure unter Rückfluss bei gelindem Sieden verseift werden. Dabei dient der Zusatz von Palmitinsäure der späteren Titration, um faßbare Mengen Fettsäuren vorzufinden. Nach annähernd vierstündigem Verseifen wird die abgekühlte Lösung mit 15-20 ml Petroläther (Siedepunkt 30-50° C) in einen Schütteltrichter überführt, in den nun außerdem noch 5 Tropfen Bromkresyl-Methylorange als Indikator gegeben werden. Nun titriert man mit 18 %iger HCl bis zum Farbumschlag des Indikators. Durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther werden ausdem Verseifungsgemisch die höheren Fettsäuren und das Cholesterin herausgespült, jeweils im Wasserbad eingedampft und am Ende mit Petroläther auf 10 ml aufgefüllt.

Diese 10 ml beinhalten die gesamten synthetisierten höheren Fettsäuren und Cholesterin.

Bestimmung der Radioaktivität der Fettsäuren

In der Aktivitätsbestimmung folgten wir der direkten Methode von C.Entenmann. Von den erhaltenen 10 ml Petrolätherauszug wird auf ein mit "Lenspaper" belegtes Aluminium-Plättchen mit Rand (Plättchendurchmesser 2,5 cm) 1 ml langsam aufgetropft.

Nun erfolgt die direkte Messung im Geigerzähler, einem Beta-Fenster-Zählrohr dünner Belegung (1 mg/cm^2), wobei konstante Arbeitsspannung und geometrischer Abstand gewahrt wurde. Korrekturen der Werte wurden gemäß den Richtlinien der "Isotopic Carbon" an Hand einer C^{14}-Standard-Folie vorgenommen.

Bei einem Ansatz finden wir einschließlich der 25 mg Palmitinsäure, die als Trägersubstanz fungiert, etwa um 30 mg Fettsäuren. Bei Blindversuchen, bei denen kein aktives Acetat zugeführt wurde, fanden sich höchstens 5-6 % der normalen Aktivität, das im Verlaufe der Aufarbeitung rein mechanisch beim Ausschütteln festgehalten wird.

Isolierung des markierten Cholesterins und Bestimmung der Radioaktivität.

Die Isolierung des C^{14}-Cholesterins läuft bis zum Auftropfen des Petrolätherauszuges auf die Aluminiumplättchen mit der Darstellung der C^{14}-Fettsäuren parallel. Die Leber-Aufarbeitung zur Isolierung des C^{14}-markierten Cholesterins verläuft folgendermaßen: 4 ml des Petrolätherauszuges werden im

Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird in 4 ml Bloorlösung (3 Teile 96%iger Alkohol + 1 Teil Äther) gelöst. Diese Lösung wird alkalisiert, indem man KOH bis zum Umschlag des zugesetzten Indikators Phenolphthalein von farblos auf rot zusetzt. Annähernd eine Stunde wird dieses Gemisch nun bei 37°C im Wasserbad verseift und mit 10 %iger Essigsäure schwach angesäuert. Im Gegensatz zu Hinkelmann und anderen (42) wurde nach Sund (43) zur Vermeidung einer Selbstabsorption und um die Plättchenbeschickung möglichst dünn zu halten, kein inaktives Cholesterin zugegeben. Die Reindarstellung des Cholesterins erfolgt durch eine Fällung mit 1%igem Digitonin in 50%igem Alkohol, wodurch unlösliches Cholesterindigitonid entsteht. Dieses Cholesterindigitonid bleibt über Nacht stehen, der Niederschlag wird auf Filterplättchen filtriert. Mit einer Aceton-Äthermischung (1 : 1) wird nachgewaschen, um alle Fettreste und unspezifischen Substanzen auszuschließen.

Die Messung der Impulse des auf dem Plättchen befindlichen C^{14}-Cholesterins wird im Methandurchflußzählrohr durchgeführt. Es ist wieder auf die gleichen Bedingungen in bezug auf Arbeitsspannung und geometrischen Abstand zu achten. Man gibt die Impulse pro Minute umgerechnet auf die ausgewogene Menge C^{14}-Cholesterin an.

Der ATP-Ferment-Test

In der Testung der ATP-Gehalte unserer Enzymsysteme folgen wir in etwas modifizierter Form der Methodik von W. Lamprecht. Es muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß das Prinzip der ATP-Bestimmung auf O. Warburg und A. Kornberg zurückgeht, danach verläuft die angewendete Reaktion in zwei Schritten:

$$\text{ATP} + \text{Glukose} \xrightleftharpoons[\text{Hexokinase}]{} \text{Glukose-6-phosphat} + \text{ADP}$$

Der folgende zweite Reaktionsschritt ist TPN abhängig. Durch quantitative Bestimmung des entstehenden TPNH läßt sich der ATP-Gehalt bestimmen.

$$\text{Glukose-6-phosphat} + \text{TPN} \xrightleftharpoons{\text{Zwischenferment}} \text{6-Phosphoglukonsäure} + \text{TPNH} + \text{H}^+$$

Im Eppendorf-Photometer läßt sich das entstandene TPNH bestimmen. TPNH hat sein Absorptionsmaximum bei 334 mμ. Die Menge des entstehenden TPNH läßt sich durch die Zunahme der Absorption leicht ablesen.

Zur Durchführung wird der Gesamtansatz im Warburg-Trog auf 4,5 ml vergrößert. Nach der im Warburg-Apparat erfolgten Inkubation werden 1,0 ml des Gemisches aus dem Trog entnommen und mit 1,0 ml 0,6%iger Perchlorsäure von 0°C enteiweißt. Die gutgemischte, enteiweißte Lösung wird ohne Verzug 10 Minuten lang unter 25 000 U/min abgeschleudert. Der saure Überstand wird abgegos-

sen und mit 0,5 n Kalilauge tropfenweise unter ständigem Rühren bis zu einem pH-Wert von 7,4 neutralisiert. Der pH-Wert wird durch Tüpfeln mit Mercks-Universalindikator bestimmt. Das Neutralisat verbleibt nun 10-15 Minuten im Eisschrank bis zur völligen Abscheidung des gebildeten $KClO_4$. Hierauf werden 1-2 ml dekantiert und ins Eisbad gestellt.

Jetzt erfolgt die eigentliche photometrische Bestimmung im Eppendorf-Photometer. Dazu eicht man den Photometer mit einem Filter von 334 µ und einem 2 cm Nickelsulfatfilter auf den Nullwert. In eine Glasküvette von 2 cm Schichtdicke werden 4 ml Triäthanol-Puffer, 0,4 ml 0,5 m Glukose und 0,2 ml 0,1 m $MgCl_2$-Lösung eingefüllt (Triäthanolpuffer: 0,3 g Triäthanol in 500ml aqua bidest. lösen. Einstellen mit 22 ml NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 und auf 1000 ml auffüllen). In die Glasküvette wird anschließend noch 0,20 ml der zu tes enden Lösung und 0,05 ml einer TPN-Lösung (2 mg TPN auf 1,0 ml aqua bidest.) hineinpipettiert. Die Küvette wird sofort in den Photometer eingebracht. Die Extinktion wird als t_0 notiert. Dann wird 0,05 ml der Fermentlösung (15 mg Hexokinase und 2 mg Warburg'sches Zwischenferment in 1 ml aqua bidest. gelöst) durch einen Plasspatel zugegeben und die Zeit gestoppt.

Man liest die Extinktionswerte genau alle zwei Minuten bis zum Stillstand der oben angeführten Warburg'schen Reaktion ab. Im Anschluß wird die Eigenextinktion der Fermentlösung bestimmt, wobei man nochmals 0,05 ml des Fermentgemisches in die Küvette gibt. Das ist der sogenannte "Rückstart". Diese Eigenextinktion wird von der Extinktionsdifferenz abgezogen.

Die ATP-Werte werden in Gamma ATP/ml Ansatz angegeben und werden in folgender W ise errechnet, wobei sich ein ausführliches Schema der Berechnung bei Morbach findet (44):

$$\frac{\Delta E \times \text{Vol ges.} \times \text{Vol über} \times M^{ATP}}{d \times \text{Vol test} \times \text{Vol lös.} \times mE^{ATP} \times 1000} = \text{Gamma ATP/ 1 ml Ansatz}$$

wobei d = Schichtdicke der Küvette in cm
Vol ges. = Gesamtvolumen d in der Küvette in ml
Vol test. = pro Küvette eingesetzte ATP-haltige Lösung in ml
E = wirkliche Extinktionsdifferenz
Vol.über. = Gesamtvolumen der enteiweissten und neutralisierten Lösung in ml
M^{ATP} = Molekulargewicht von ATP
mE^{ATP} = molare Extinktion von ATP

Da die meisten Werte konstant sind, ergibt sich die vereinfachte Formen:

$\Delta E \times 1,02 \times \text{Vol über} = \text{Gamma ATP/1 ml Ansatz}$

ERGEBNISSE

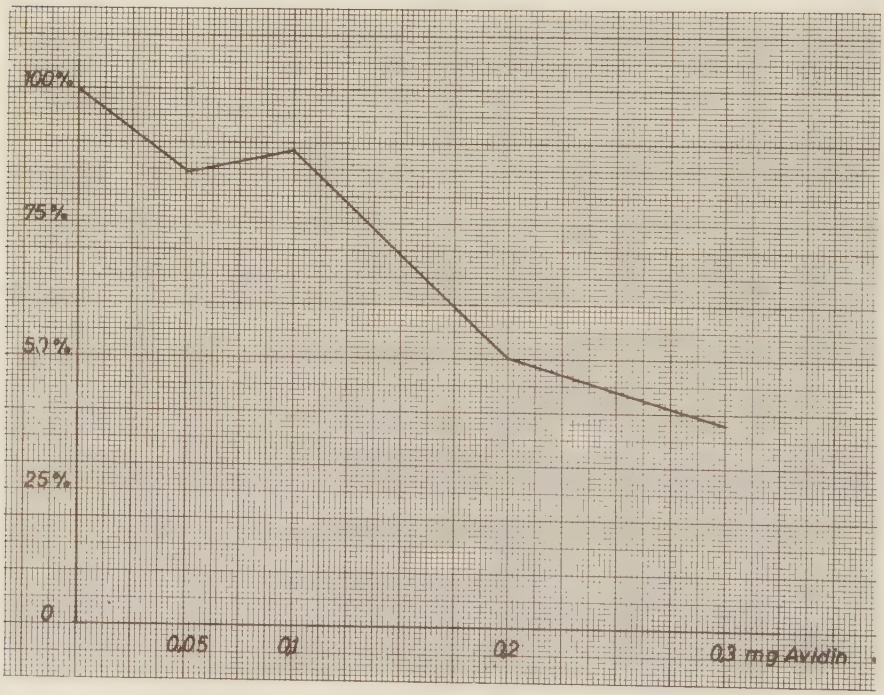
In diesem Abschnitt werden die Versuchsergebnisse sowohl tabellarisch als auch graphisch dargestellt und auf die Besonderheiten ohne Wertung aufmerksam gemacht.

Sollten die einzelnen Versuche miteinander verglichen werden können, bedarf es bei der zum Teil beträchtlich schwankenden Fettsäuresynthesefähigkeit der jeweiligen supernatant-fluid-Präparationen (zwischen 400 und 7900 Impulse pro Minute, was sicher auf dem verschiedenen Gehalt der Hormogenate an Fermenten und ATP beruht) einer Möglichkeit, sich auf eine gemeinsame Größe zu beziehen. Das läßt sich dadurch erreichen, daß die Ausgangsradioaktivität des supernatant-fluid (sup) immer gleich 100% betrachtet wird. Die Impulszahlen der Versuchsansätze mit Avidin im Eiklar, Avidin in Reinsubstanz und Biotin werden nun jeweils als Prozente des Ausgangswertes umgerechnet. Es ist verständlich, daß bei den ATP-Verbrauchsbestimmungen der O-Minutenwert des "Sups" als Ausgangswert anzusehen ist.

DIE ABHÄNGIGKEIT DER FETTSÄURESYNTHESE VON STEIGENDEN KONZENTRATIONEN AVIDIN IM EIKLAR

Abbildung 1
veranschaulicht eindrucksvoll die Hemmung der Fettsäuresynthese durch steigende Avidinkonzentrationen. 0,05 bis 0,3 mg Avidin aus Eiklar erbringt eine Hemmung auf rund 38 %.

Lfd. Nr.	Sup	0,05	0,1	0,2	0,3	mg Avidin im Eiklar
507	3130		2880	1928		
515	2718			1550	1493	
612	1279		1066	644		
643	3965	3540	4170	2085	1458	
645	1308	922	453	175	110	
Gesamt	12400	4462	8571	6382	3061	
Mittel	2480	2231	2143	1276	1020	
%	100%	84,6%	88,5%	50,2%	38,3%	
	Supmittelw.		→	→	→	
		2647	2421	2480	2664	

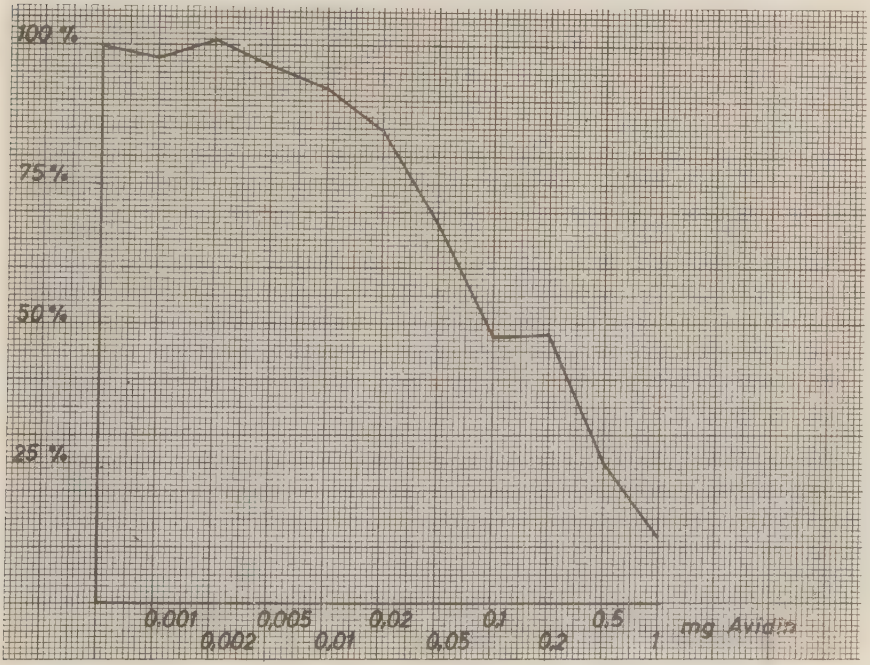


DER EINFLUSS VON AVIDINKONZENTRATIONEN AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 2

läßt das Gefälle der Fettsäuresynthesehemmung durch steigende 0,001 bis 1 mg Avidinkonzentrationen deutlich werden.

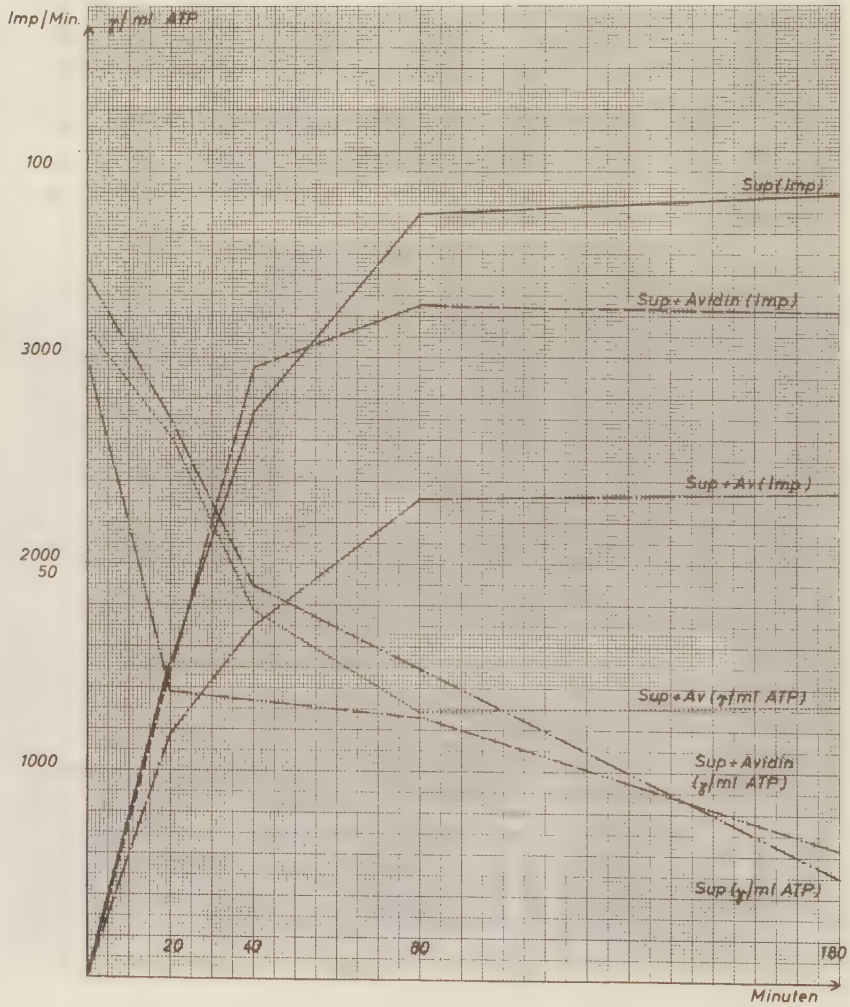
Lfd. Nr.	Sup	mg Avidin 0,001	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1
612	1279				1218	781	603	594	548		
642	2485	2450	2895	2550	2345	2265	1740	995	1210	372	190
644	2460	2365	2135	2185	2205	2210	1816	1248	1233	856	487
646	4970						4140	3075		2095	
650	1108				1002		734	383		238	136
652	2585						1485	1235		362	
675	2800						1542	905		218	191
Ges.	17687	4815	5020	4735	6770	5256	12060	8435	2991	4140	1004
Mit.	2527	2407	2510	2367	1693	1752	1723	1205	997	690	251
%	100%	97,5%	101,5%	95,8%	92,4%	84,5%	68,1%	47,6%	48,0%	25,2%	11,3%
	Supmittelw.	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
		2473	2473	2473	1833	2075	2527	2527	2075	2735	2213



ATP - TEST (VERSUCH 629)
0,26 mg AVI DIN (AV)
0,26 mg AVIDIN AUS EIKLAR

Abbildung 3

Der ATP-Ferment-Test mit gleichen Gaben Avidin im Eiklar und Avidin in Reinsubstanz bringt zum Ausdruck, daß bei stärkerer Hemmung der Fettsäuresynthese durch reines Avidin (2320 Impulse/Minute) größere ATP-Mengen (33 Gamma) noch im Ansatz verbleiben, während es bei geringerer Hemmung durch Avidin im Eiklar (3220 Impulse/Minute) nur kleine ATP-Mengen im Ansatz verbleiben (15 Gamma).

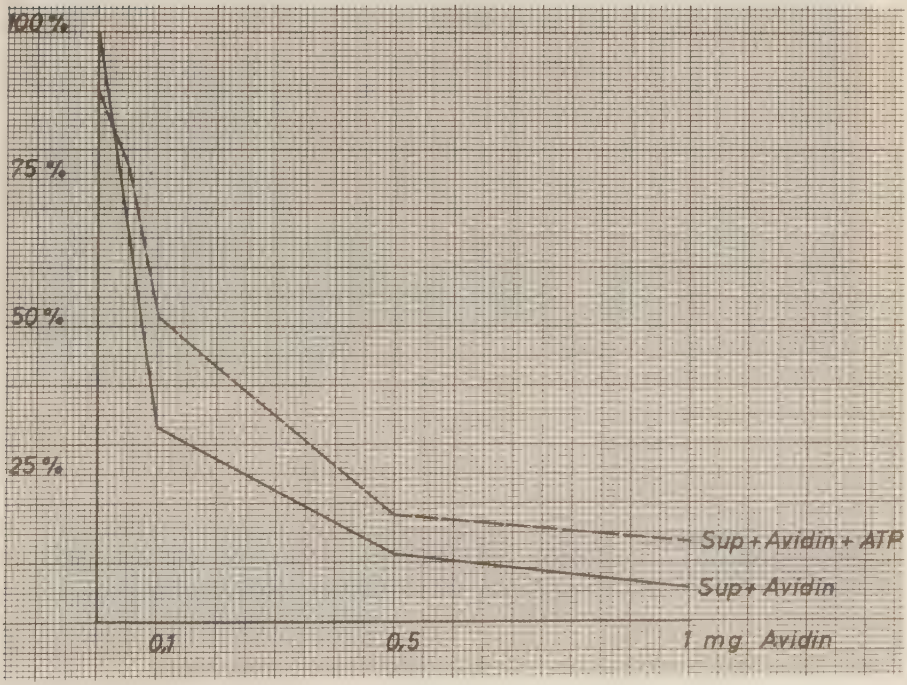


DIE WIRKUNG VON ATP AUF DIE VON AVIDIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 4

läßt die stets synthesefördernde Wirkung von ATP auf die durch Avidin zum Teil extrem gehemmte Fettsäuresynthese erkennen. Der Sup selbst wurde von ATP nicht gefördert, eher geringgradig gehemmt.

Lfd. Nr.	Sup	0,05	0,1	0,5	1 mg AV	1 mg AV + 0,05 ATP →	1 mg AV + 0,1 ATP →	1 mg AV + 0,5 ATP →	1 mg AV →
650	1108	734	383	238	136	1093	728	585	488	308
675	2800	1542	905	218	191	2420	2260	1418	208	227
Ges.	3908	2276	1288	456	227	3513	2988	2003	696	535
Mit.	1954	1138	644	228	113	1757	1494	1002	348	268
%	100%	67,9%	32,9%	11,7%	5,8%	89,9%	76,5%	51,3%	17,8%	13,7%



DIE EINWIRKUNG VON COA AUF DIE DURCH AVIDIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 5

Lfd.						100γ	CoA→	→	→	
Nr.	Sup	0,05	0,1	0,5	mg AV	Sup	0,05	0,1	0,5	mg Avidin
646	4970	4140	3075	2095		4320	4550	3890	2685	
%	100%	83,3%	61,8%	42,2%		86,8%	91,6%	78,3%	54,0%	

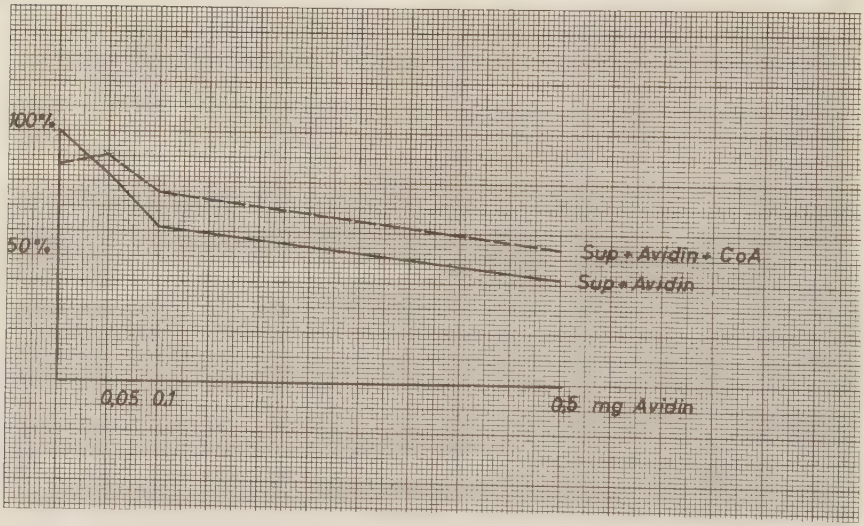


Abbildung 5 bietet die Förderung der Fettsäuresynthese durch CoA nach anfänglicher Hemmung durch steigende Konzentrationen von Avidin.

EINWIRKUNG VON CO_2 AUF DIE DURCH AVIDIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 6

Lfd.				CO_2 →	→	
Nr.	Sup	0,1	0,5 mg Avidin	Sup	0,1	0,5 mg Avidin
673	3135	2209	801	3939	3398	990
%	100%	70,4%	25,0%	125,6%	108,7%	31,5%

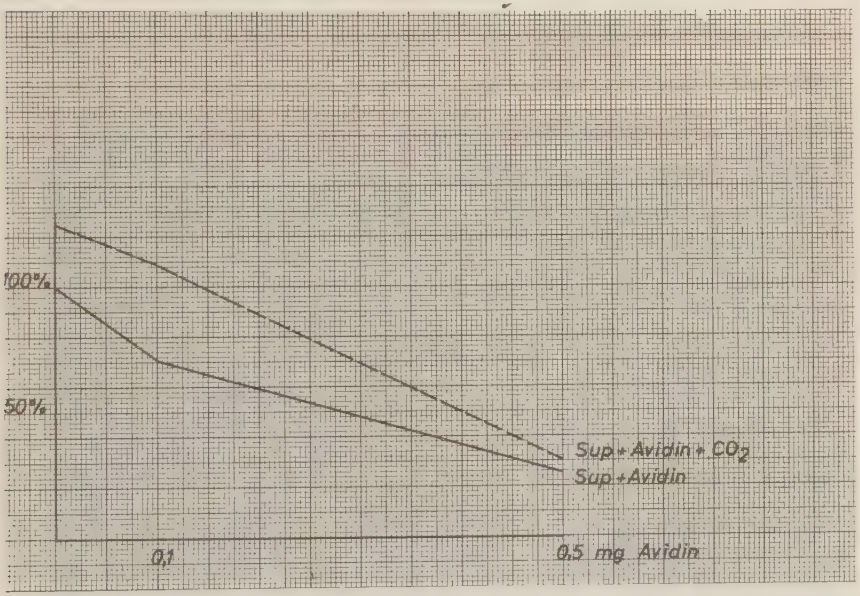


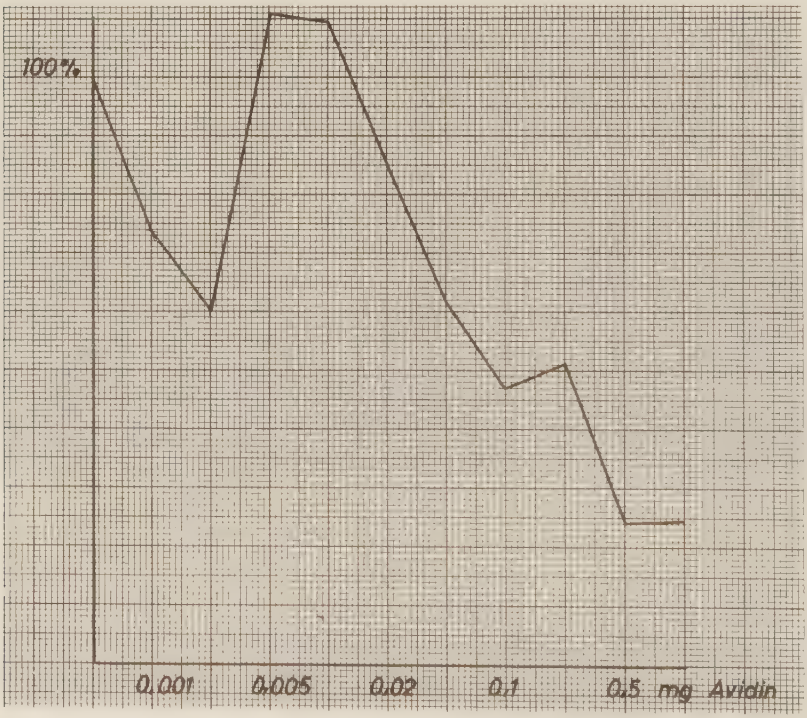
Abbildung 6 gibt Aufschluß über den fördernden Einfluß von CO_2 auf die durch Avidin gehemmte Fettsäuresynthese.

DIE ABHÄNGIGKEIT DER CHOLERSTERINSYNTHESE IN DER LEBER VON DER AVIDINKONZENTRATION

Abbildung 7

weist auf die Lebercholesterinsynthese hin, die bei steigender Avidinkonzentration nach anfänglichen Schwankungen (0,001 bis 0,005 mg Avidin) eindrucksvoll abfällt.

Lfd.							mg Avidin				
Nr.	Sup	0,001	0,002	0,005	0,01	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	1
642	3666	1731	3268	3445	3842	3608	2624	1124	1371	734	485
644	4093	3973	1367	4911	4458	3027	2098	1589	1584	1627	919
Ges.	7759	5704	4635	8356	8300	6635	4722	2713	2955	1363	1404
Mit.	3879	2852	2318	4178	4150	3318	2361	1356	1478	682	702
%	100%	73,5%	59,7%	110,5%	109,7%	85,5%	60,8%	47,1%	51,3%	23,7%	24,3%

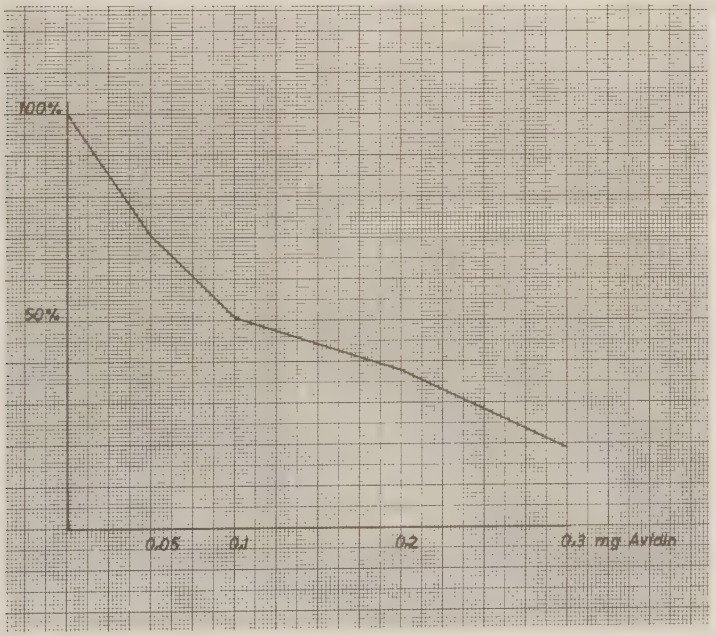


DIE ABHÄNGIGKEIT DER CHOLESTERINSYNTHESEHEMMUNG IN DER LEBER VON DER HÖHE DER AVIDINKONZENTRATIONEN

Abbildung 8

stellt die Lebercholesterinsynthesehemmung dar, die Hand in Hand mit der in Abbildung 1 dokumentierten Abhängigkeit (im Sinne einer Hemmung) der Fettsäuresynthese von der Höhe der Avidin - im - Eiklar - Konzentration einhergeht.

Lfd. Nr.	Sup	0,05	0,1	0,2	0,3	mg Avidin im Eiklar
643	4677	3162	2179	1598	764	
645	851	737	625	503	292	
Gesamt	5528	3899	2804	2101	1056	
Mittel	2764	1950	1402	1050	528	
%	100%	70,5%	50,7%	38,0%	19,1%	

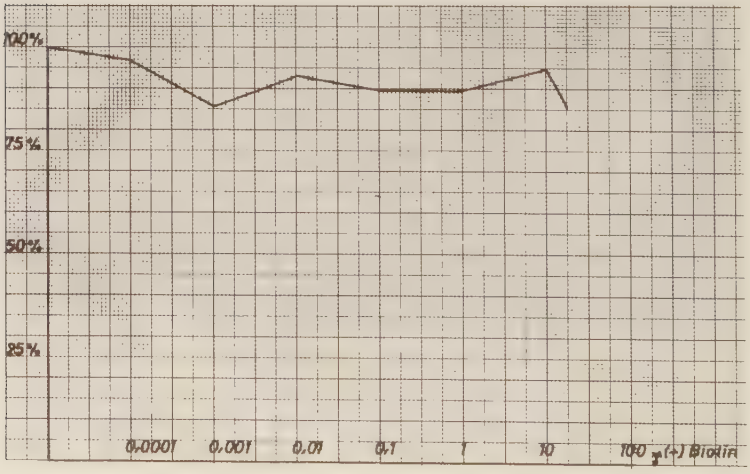


DER EINFLUSS VON BIOTINKONZENTRATIONEN AUF DIE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 9

vermittelt Einblick in die durch steigende Biotinkonzentrationen (0,0001 γ bis 25 γ) nur ganz unwesentlich und uncharakteristisch gehemmte Fettsäuresynthese.

Lfd. Nr.	Sup	0,0001	0,001	0,01	0,1	1	10	25
						γ (+) Biotin		
541	2130	2200	1869	1762	2358			
627	1682	1546	1410	1488				
643	3965	3855		3720	3695	3675	3840	
645	1308	1042	1188	1164	1332	1323	1348	
647	404	359	372	363	471	493	463	
649	2115	2268		2040	2225			
651	1453	1182	1125	1062	1232	1071		
653	767	897		825			765	
679	2566	2375	2210	2210			2140	
680	3450	3840		3970			3640	
707	3850	3220			3570	3220	3660	3550
708	7960	7030			7350	7020	7200	6430
709	2820	2900			3080	2670	2705	2560
Gesamt	34470	33714	5964	18604	23255	19472	25761	12540
Mittel	2670	2593	1193	1860	2584	2782	2870	4180
%	100%	97,1%	85,5%	93,7%	89,4%	89,5%	95,3%	85,8%
		Supmittelw.→	→	→	→	→	→	→
			1395	1984	2889	3109	3010	4877

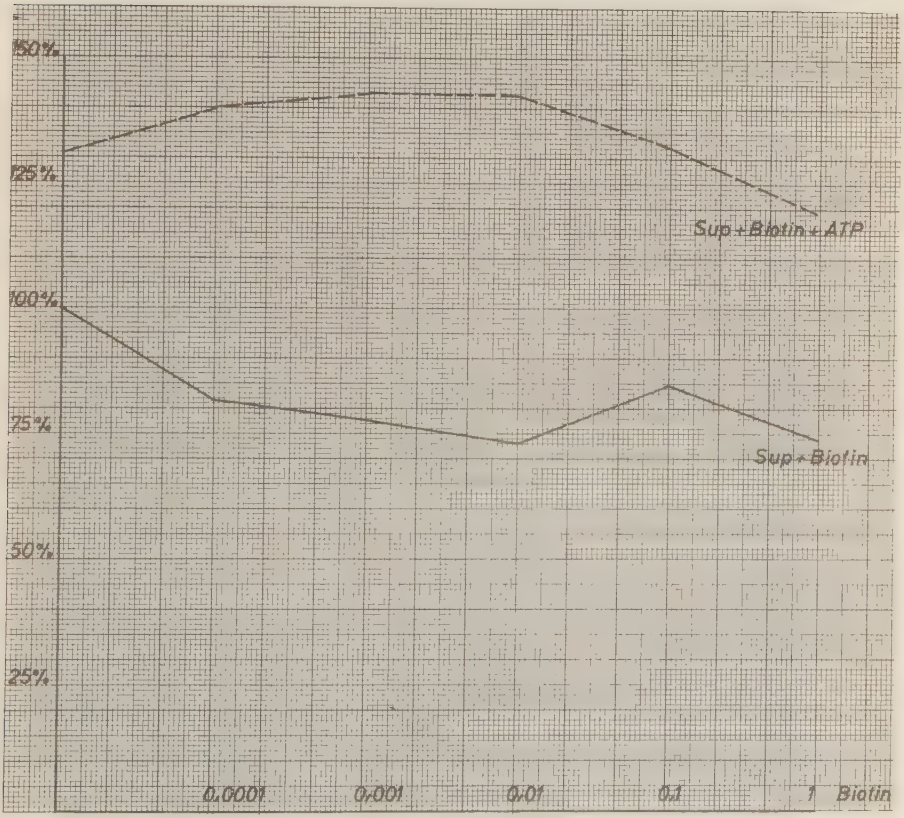


DIE EINWIRKUNG VON ATP AUF DIE DURCH BIOTIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 10
illustriert die zum Teil enormen Förderungen der Fettsäuresynthese nach Zusatz von ATP zu den durch Biotin leicht gehemmten Ansätzen.

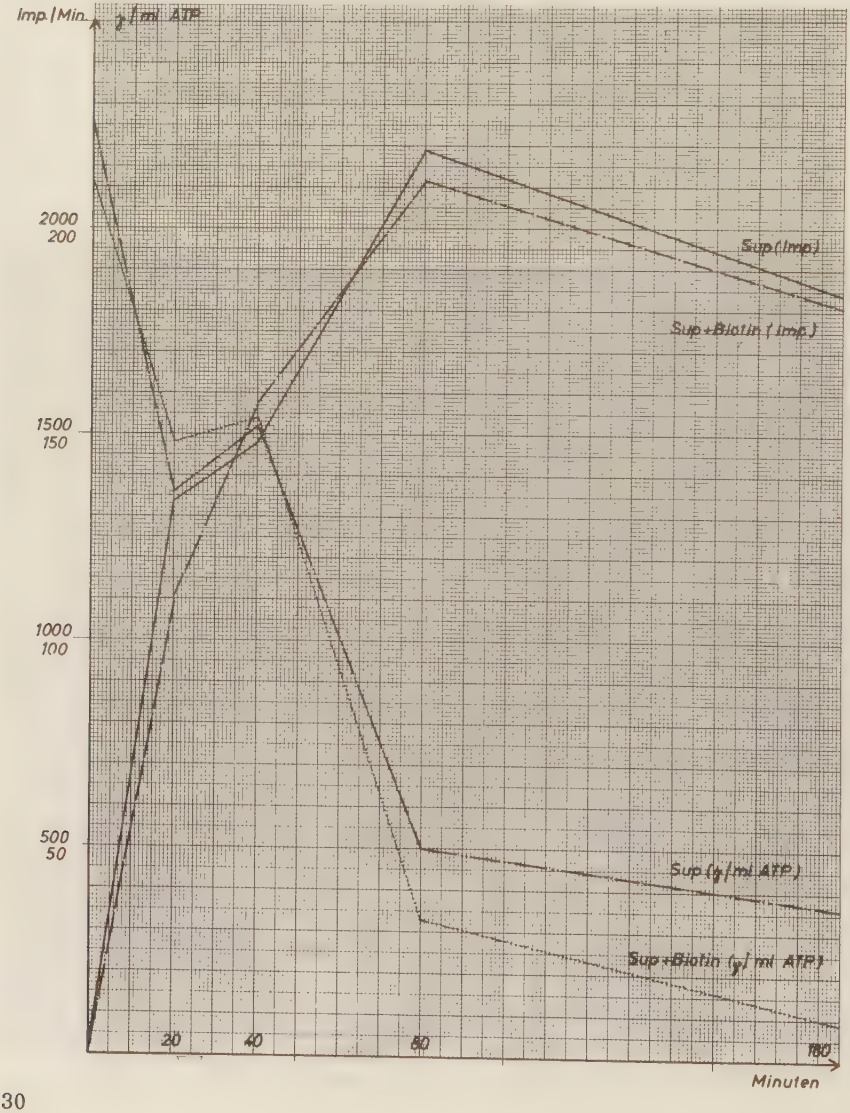
Lfd. Nr.	Sup	1	0,1	0,01	γ Biotin 0,001	0,0001	Sup + 1mg ATP
561	1453	1071	1232	1062	1125	1182	1895
%	100%	73,7%	84,7%	73,1%	77,4%	81,5%	130,5%

	1	0,1	0,01	0,001	0,0001 γ Biotin
1 mg ATP →	→	→	→	→	→
Sup →	→	→	→	→	→
	1728	1933	2068	2083	2064
	119,0%	132,8%	142,2%	143,2%	140,0%



ATP - TEST (VERSUCH 558)
0,0001 γ BIOTIN

Abbildung 11
zeigt den vermehrten ATP-Verbrauch bei Biotin-Zugabe (Sup + Biotin 9 Gamma ATP/ml Ansatz) gegenüber dem ATP-Verbrauch des Ausgangshomogenates ohne Zusatz ("Sup") mit 36 Gamma ATP/ml Ansatz.

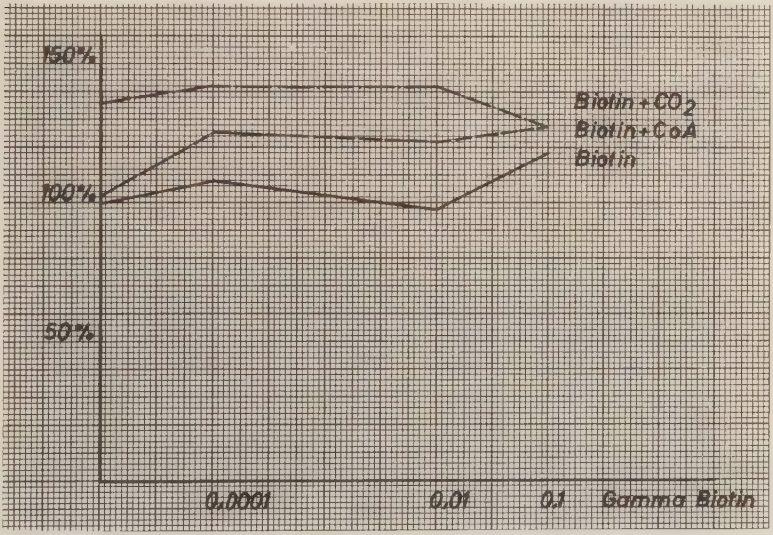


DIE EINWIRKUNG VON COA AUF DIE DURCH BIOTIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

Abbildung 12

weist auf den fördernden Einfluß von CoA, auf den noch stärker fördernd wirkenden Einfluß von CO_2 auf die durch Biotin (- im Sinne einer schwach synthesefördernden -) beeinflußten Fettsäuresynthese hin.

Lfd.				γ Biotin	+ 100 γ CoA			
Nr.	Sup	0,0001	0,01	0,1	Sup	0,0001	0,01	0,1 γ Biotin
649	2115	2268	2040	2225	2275	2356	2655	2500
860	3760	4100	3730	4710	3850	5020	4490	5050
Gesamt	5876	6368	5770	6935	6125	7376	7145	7550
Mittel	2938	3184	2885	3468	3063	3688	3573	3775
%	100%	108,4%	98,3%	118,1%	104,1%	125,5%	121,5%	128,5%



DIE EINWIRKUNG VON CO_2 AUF DIE DURCH BIOTIN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

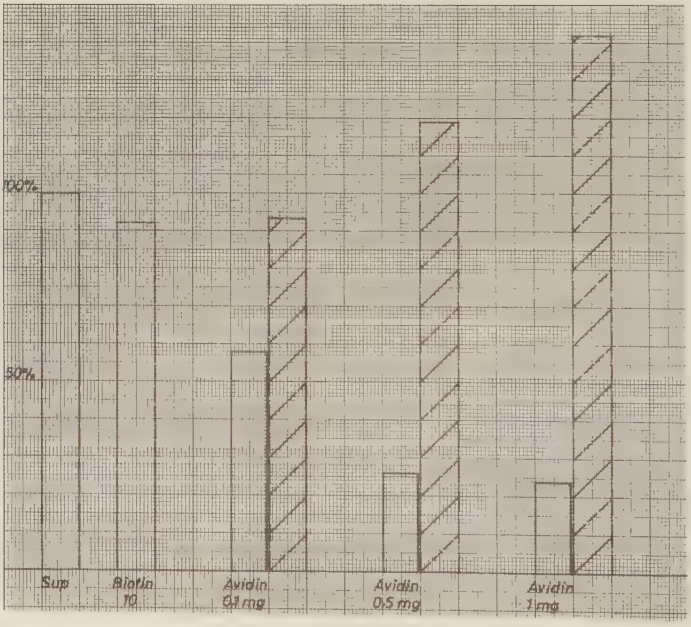
Lfd.	+ CO_2	→	→	→	
Nr.	Sup	0,0001	0,01	0,1	γ Biotin
649	3377	3325	3330	2837	
860	4625	4950	5050	4690	
Gesamt	8002	8275	8380	7520	
Mittel	4001	4138	4195	3760	
%	136,1%	141,0%	142,5%	128,0%	

DAS EINWIRKEN VON 10 γ BIOTIN AUF DIE DURCH VERSCHIEDENE AVIDINKONZENTRATIONEN BEEINFLUSSTE FETTSÄURESYNTHESE

ABBILDUNG 13

demonstriert Versuche aus einer großen Zahl von Avidin-Biotin-Kombinationsversuchen, bei denen es bei einer bestimmten Biotinmenge (10 γ) zu außerordentlichen Förderungen der Fettsäuresynthese (von 24 % auf 141 %) kam, obwohl sie durch Avidingaben (0,1 mg, 0,5 mg und 1 mg) zum Teil extrem stark (bis auf 24,4 %) gehemmt war.

Lfd.		mg Avidin			Biotin	10	10	10 γ Biotin
Nr.	Sup	0,1	0,5	1	10 γ	0,1	0,5	1 mg Avidin
652	2585	1235	361					
653	767		177	146	765		1312	1680
654	1969	873	670					
655	3113	2275			2590	2747		
677	2365	1056	149					
679	2566	1905			2140	2630		
680	3450		1510	886	3640		3717	4310
Gesamt	16815	7349	2867	1032	9135	5377	5029	5990
Mittel	2402	1469	573	516	2284	2689	2515	2995
%	100%	58,3%	25,9%	24,4%	92,3%	93,5%	119,1%	141,9%
Supmittelw.		2519	2207	2109	2474	2839	2109	2109



ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE UND IHRE DISKUSSION

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse, der in dem vorausgegangenen Kapitel graphisch dargestellten, experimentellen Untersuchungen, hat folgendes Aussehen:

1.) Steigende Konzentrationen von chem. reinem Avidin hemmen die Fettsäuresynthese bis maximal 11 %. Unterstrichen wird dieses Ergebnis durch die durch Avidin im Eiklar etwa parallel laufenden Werte.

2.) ATP-Zugaben förderten stets die Ausbeute an synthetisierten radioaktiv-markierten Fettsäuren der durch Avidin gehemmten Fettsäuresynthese. Der "Sup", die Fettsäuresynthese des Ausgangsfermentsystems, wurde durch ATP nur unwesentlich verändert.
Auch CO_2-Begasung und CoA-Zusatz bieten das gleiche Bild der Förderung der durch Avidin zum Teil stark gehemmten Fettsäuresynthese.

3.) Die Cholesterinsynthese des Fermentsystems aus Taubenleber fällt bei stärkeren Avidinkonzentrationen sowohl beim reinen Avidin als auch beim Avidin im Eiklar ab.

4.) Ein gravierender Einfluß von Biotin auf die Fettsäuresynthese läßt sich auch durch breitangelegte Versuche (0,0001 - 25 γ Biotin) nicht erkennen.

5.) Zugabe von ATP fördert die durch Biotin nur unwesentlich beeinflußte Fettsäuresynthese.

6.) CO_2-Begasung fördert die durch Biotin nur unwesentlich veränderte Fettsäuresynthese noch eindrucksvoller als durch CoA-Zugabe.

7.) Nur bei einer bestimmten Konzentration von Biotin (10 gamma) gelang ein überzeugender Effekt in den Avidin-Biotin-Kombinationsversuchen. Es ließ sich die durch Avidin auf 24 % gehemmte Fettsäuresynthese auf 140 % nach Biotinzugabe fördern.

Ad 1 - Abbildungen 1, 2 und 3

Zu etwa den gleichen Ergebnissen kommt Wakil in seiner Arbeit über die Hemmung der Fettsäuresynthese durch Avidin und ihre Aufhebung durch Biotin (30). Wie läßt sich die Hemmung durch Avidin erklären? Wie aus der Einleitung hervorgeht, weiß man vom Avidin eigentlich nur, daß es als Rieseneiweißmolekül das Biotin fest an sich bindet. Wenn man mit Lynen (6) annimmt, daß im Verlaufe der Fettsäuresynthese beim Vorgang der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA Biotin als prosthetische Gruppe des Enzyms Beta-methyl-crotonyl-CoA-carboxylase vorhanden sein muß, dann ist unschwer einzusehen, daß einmal mit steigenden Avidinzugaben und zum anderen bei dem festen Bindungsverhältnis von Avidin zum Biotin Biotin als entscheidender Faktor bei der Carboxylierungsreaktion ausfällt und damit eine Hemmung der Fettsäuresynthese eintreten muß.

Der ATP-Ferment-Test unterstützt diese These. Weil es nach Avidinzugabe zu einer reduzierten Fettsäuresynthese infolge verm(h)inderter Bereitstellung von

Biotin für den Carboxylierungsvorgang kommt, kann erwartet werden, daß mehr ATP - das nun neben CO_2 nicht benötigt wird - im Ansatz verbleibt. Diese Vermutung findet sich bestätigt. Bei stärkerer Hemmung durch reines Avidin als durch Avidin im Eiklar findet man auch größere Mengen ATP.

Daß es zu einer Hemmung der Fettsäuresynthese durch das im Eiklar vorhandene Avidin kommt - allerdings einer nur auf 38 % gehemmten - zeigt, daß es physiologischerseits nicht nur eine starre Bindung von Avidin-Biotin gibt, sondern daß es auch hier eine Gleichgewichtsreaktion von Bindung auf der einen Seite und reaktionsfähigem Zustand auf der anderen gibt. Ein gewisser Prozentsatz Biotin dürfte also für die Carboxylierungs- und anderen Reaktionen, die in der Einleitung ausführlich abgehandelt wurden, zur Verfügung stehen.

Der Einfluß von 100 Gamma Coenzym A auf die durch steigende Avidinkonzentrationen in ihrer Synthesefähigkeit gehemmte Fettsäurebildung zeigt sich in einer stetigen, allerdings geringgradigen Förderung. Der "Sup" selbst wurde durch Coenzym A nicht gefördert, was aufzuzeigen scheint, daß für die biochemische Reaktion kein zusätzliches Coenzym A zu stärkerer Förderung benötigt wird, da in dem Enzymsystem ausreichende Mengen CoA vorhanden sind. Schwieriger ist die sich anschließende Frage zu beantworten, warum es bei den Avidinversuchsansätzen durch CoA-Zugabe zu einer Aufhebung bzw. gewissen Förderung der Syntheseleistung kommt. Man wird eventuell, wie schon weiter oben bei der Förderung der Synthese durch ATP diskutiert, annehmen dürfen, daß der Avidin-Biotin-Komplex auch hier nicht als festgefügter Block überhaupt kein Biotin als Beta-methyl-crotonyl-CoA-carboxylase dem Carboxylierungsvorgang als Ferment freigibt, so daß damit doch wenigstens ein Teil des benötigten Enzymes für die Katalyse zur Verfügung gestellt werden kann. Dieser "freie", nicht an das Protein Avidin gebundene Teil des benötigten Biotins gelangt damit in den Reaktionsablauf der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Das heißt, das Coenzym A wird nach den grundlegenden Erkenntnissen Lynens aus Pyruvat acetyliert und damit reaktionsfähig gemacht. Dann erst kann der erwartete Weg eingeschlagen werden. Man kann aber vielleicht noch weiter in der Annahme gehen, daß das Acetyl-CoA einen dermaßen reaktionsfähigen Charakter hat, daß es das zum weiteren Ablauf von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA unerläßlich benötigte Biotin als Coferment dem Avidin-Biotin-Komplex zu entreißen imstande ist.

Die Einwirkung von Kohlendioxyd auf die durch Avidin im hemmenden Sinne beeinflußte Fettsäuresynthese zeitigt auch beim "Sup", dem Versuchsansatz ohne Avidinzugabe, eine Förderung der Synthese (38). Dieser fördernde Einfluß kann verhältnismäßig leicht erklärt werden, vergegenwärtigt man sich die Abhängigkeit des Carboxylierungsvorganges von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA von dem Vorhandensein d.h. vom mehr oder minder starken Angebot des Kohlendioxydes. Hierbei entsteht intermediär aktives CO_2 in Form einer CO_2-Biotin-Enzym-Verbindung. Außerdem muß, wie das einleitende Schema und die oben geschilder-

ten ATP-Zusatz-Versuche ergaben, ATP als Energielieferant vorhanden sein. Durch CO_2-Begasung wird also das Angebot von Kohlendioxyd so entscheidend verbessert, daß es bei ausreichender Energielieferung durch das ATP zu einem significanten Anstieg der Fettsäuresynthese kommt, mag das Biotin durch Zugabe von Avidin auch stark in seiner Reaktionsfähigkeit durch Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes gebunden sein.

Ad 2 - Abildung 4, 5 und 6

Die Wirkung von ATP auf die von Avidin im hemmenden Sinne beeinflußte Fettsäuresynthese zeigt sich in einer stets die Hemmung um einige Prozent aufhebenden Wirkung auf die Höhe der Synthese. Die Reaktion der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA erfordert, wie das Schema in der Einleitung zeigt, ATP. Es handelt sich also um einen endergonischen Vorgang. Darauf weisen auch Flavin, Ochoa und Knappe hin (36, 35, 37). Zugabe von ATP hob entweder die durch Avidin gehemmte Fettsäuresynthese geringgradig wieder auf oder ließ es erst überhaupt nicht zu einer stärkeren Hemmung durch Avidin kommen. Letzterer Deutungsversuch wird für wahrscheinlicher gehalten, da man sich vorstellen kann, daß durch eine hohe ATP-Konzentration, noch bevor es zur eigentlichen Bildung des Avidin-Biotin-Komplexes kommt, und damit zum Ausfall der prosthetischen Gruppe für die Katalyse, der Carboxylierungsvorgang wenigstens von einem Teil der Moleküle in Angriff genommen werden kann. Unterstrichen wird diese These durch das Resultat der ATP-Einwirkung auf den "Sup", d.h. das ohne Avidin beeinflußte Homogenat. Hier wurde überhaupt keine Förderung erzielt.

Ad 3 - Abbildungen 7 und 8

Die Abhängigkeit der Cholesterinsynthese aus Taubenleberenzymsystemen von der Höhe der Avidinkonzentrationen ist, wie unsere Versuche zeigen, evident. Von einer bestimmten Konzentration an (0,005 mg Avidin/3 ml Versuchsansatz) wird die Cholesterinsynthese immer stärker eingeschränkt. Zunächst liegt die Vermutung nahe, daß Avidin - wie etwa mit dem Biotin - einen Komplex mit einer anderen Verbindung (Enzym?) eingeht und daß es somit zu einem Ausfall von intermediär wichtigen Substanzen kommt, die für die Cholesterinsynthese von entscheidender Bedeutung sind. Doch ist darüber bislang vom Avidin nichts bekannt.

Zum anderen wird man in der Cholesterinsynthese nach den Vorgängen suchen müssen, wo etwa Biotin als Coenzym in Frage kommen könnte, um den Ablauf der Synthese zu katalysieren. Hierbei benutzen wir Gedanken Lynens (6), der vermutet, daß es nicht ein Biotin-Enzym, sondern - wie die Wirkgruppe Flavin in den verschiedenen Flavin-Enzymen wirkt - mehrere Einflußmöglichkeiten für das Biotin gibt. Eine Reaktion, die mit CO_2 und H_2O-Eliminierung einhergeht, dürfte mit größter Wahrscheinlichkeit der Hauptangriffspunkt des Biotin-Enzyms sein, und zwar handelt es sich in der Cholesterinsynthese bei der Bildung des Squalens aus der Mevalonsäure um den Schritt von der 5-Pyrophosphomevalonsäure zum

Isopentenyl-pyrophosphat. Hierbei kommt es bei ATP-Beanspruchung zu H_2O-Eliminierung und CO_2-Abspaltung, was eventuell durch die katalytische Wirkung von Biotin bewirkt werden könnte. Biotin aber bindet sich mit dem Avidin in unseren Versuchen zum Avidin-Biotin-Komplex und stünde damit diesem eben erwähnten Vorgang nicht zur Verfügung.

Die Cholesterinsynthese-Versuche geben Gelegenheit, wenigstens als Anregung aufmerksam zu machen,durch geeignete Tierversuche mit Avidingaben eventuell Hemmungen der Cholesterinsynthese zu erzielen, was bei uns bei grob orientierenden Versuchen stets scheiterte, da Vergleichswerte v o r der Fütterung nicht zu erhalten sind (die Taube müßte vor und nach der Fütterung Leber liefern können!). Damit könnte diesen Untersuchungen echte Bedeutung zugemessen werden.

Ad 4 - Abbildung 9

Nach den in der Einleitung über die biochemische Funktion des Biotin dargestellten Erkenntnissen überrascht die Tatsache, daß, wie unsere Versuche zeigen, der Einfluß steigender Biotin-Konzentrationen auf die Fettsäuresynthese keine Förderung, allerdings auch keine ausgesprochene Hemmung der Synthese zeigt. Selbst wenn man bei unseren physiologischen Ansätzen Schwankungen des Enzymgehaltes einkalkuliert, so ist bei dieser Anzahl von Versuchen der Eindruck doch der, daß auf jeden Fall zusätzliche Gaben von Biotin für eine Synthesesteigerung von unwesentlichem Einfluß sind.

Ad 5 - Abbildung 10 und 11

Die Erklärung, warum es bei Zugabe von Biotin nicht zu der eigentlich erwarteten Zunahme der Synthese kommt, wird durch das Ergebnis der Einwirkung von ATP auf die durch Biotin beeinflußte Fettsäuresynthese gegeben. Der Vorgang der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA erfordert, wie schon mehrfach hervorgehoben, ATP. Das ATP im Ansatz reicht nach Zugabe von Biotin nicht aus, um den Carboxylierungsvorgang für die angebotene Menge Biotin zu unterstützen. Ist aber zusätzlich ATP vorhanden, so kann das beigefügte Biotin als Coferment seine Funktion - im Sinne einer Synthesesteigerung - erfüllen.

Der ATP-Ferment-Test beleuchtet dieses Ergebnis von der energetischen Seite. Gaben von Biotin erfordern nach dem eben Gesagten eine verstärkte ATP-Bereitstellung. Die Kurve zeigt, daß bei Biotinzusatz die Energiequellen in Form des ATP noch stärker beansprucht werden: Im Sup 36 Gamma/ml Ansatz, bei Sup+Biotin 9 Gamma/ml Ansatz.

Ad 6 - Abbildung 12

Die durch Biotinzugabe nur unwesentlich beeinflußte Fettsäuresynthese erfährt durch das Coenzym A eine deutliche Förderung. Wie schon bei der Förderung der durch Avidin gehemmten Fettsäuresynthese hingewiesen wurde, kann man sich auch in diesem Falle die Förderung dadurch verständlich machen, daß es durch zusätzliche Gabe von Coenzym A und dadurch angeregte Bildung von Acetyl-CoA

aus dem Pyruvat mit Hilfe des ebenfalls in Ansatz gebrachten Biotins eine Steigerung der Synthese ermöglicht wird, weil weitere Bausteine vorhanden sind. Doch scheint diese Reaktion stärker von CO_2 und ATP-Lieferung abhängig zu sein als bei Zugabe von CO_2 anstelle von Coenzym A, wie das die Höhe der Radioaktivität, die für uns Ausdruck der Fettsäuresynthese ist, anzeigt.

CO_2 fördert die Synthese stärker als das Coenzym A, was auf die besondere Abhängigkeit des Carboxylierungsvorganges vom CO_2-Angebot hinweist. Für die Reaktion vom Acetyl-CoA zumMalonyl-CoA wird CO_2 und ATP benötigt. Wenn nun CO_2 durch Begasung sehr reichlich angeboten wird, kann die Synthese bei zusätzlicher Gabe von Biotin, als dem unentbehrlichen Coferment dieser Reaktion, verstärkt ablaufen, allerdings nicht über ein gewisses Maß hinaus, da es sich um einen endergonischen Vorgang handelt, der ATP benötigt.

Ad 7 - Abbildung 13

Im Gegensatz zu Wakil Titchener und Gibson (30), denen in allen Versuchen durch Biotin eine Aufhebung der durch Avidin gehemmten Fettsäuresynthese gelang, sind bei uns nur Ansätze mit der bestimmten Biotin-Konzentration von 10 Gamma in der Lage, die durch steigende Konzentration Avidin (0,1-0,5-1 mg/3 ml Ansatz) bis zu 24 % gehemmte Synthese nicht nur aufzuheben, sondern im speziellen Falle von 24 %iger Hemmung durch Avidin bis auf 140 % zu steigern, also über den "Sup"-Wert hinaus.

An und für sich ist eine Aufhebung der Hemmung nach vorausgegangenem Avidinzusatz durch eine Biotingabe leicht einzusehen, weil es nach Biotinzugabe wieder "freies", das heißt nicht nur Avidin-Komplex-gebundenes Biotin gibt, das als Coferment dem Carboxylierungsvorgang wieder zur Verfügung steht.

Eine Deutung der erzielten Ergebnisse fällt schwer, denn ATP und CO_2, die für den Ablauf der Reaktion vorhanden sein müssen, scheinen genügend angeboten worden zu sein, wie die Ergebnisse mit der erstaunlichen Förderung auf 140 % beweisen. Somit kommen wahrscheinlich unbekannte Faktoren zur Geltung, die wir nicht genügend erfassen können, da uns zu unseren Versuchen nur physiologische Homogenate, nicht aber exakt zusammengestellte Enzymsysteme zur Verfügung standen.

Wir können jedoch darauf hinweisen, daß trotz sehr vieler Versuche, bei denen es nach Hemmung der Fettsäuresynthese durch Avidin nicht zu einer Aufhebung durch Biotin kam, bei den Experimenten mit 10 Gamma Biotin gelang, die vorher erwartete Aufhebung beziehungsweise Förderung der Fettsäuresynthese zu erzielen.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitend wurde besonders eingehend die Rolle des Biotins, der uns bislang als aktiver bekannten Komponente des Avidin-Biotin-Komplexes, im Intermediärstoffwechsel beleuchtet. Es wurde dabei auf die Entdeckung Lynens aufmerksam gemacht, daß das Enzym Beta-methyl-crotonyl-CoA-Carboxylase Biotin enthält und dieses mit der Wirkgruppe identisch ist.

Die Problemstellung ergab sich aus der Suche nach physiologisch vorkommenden Stoffen, die die Fettsäuresynthese möglichst stark hemmen, wobei wir auf das im Hühnereiweiß vorkommende Avidin stießen. Da die Erklärungsversuche bei Experimenten mit Avidin allein nicht genügend erschienen, folgten Versuche mit dem an Avidin verankerten Biotin. Durch zusätzliche Untersuchungen über den Einfluß von CO_2, ATP und CoA, die Bestimmung des ATP-Verbrauchs während der Synthese und die Höhe der Cholesterinsynthese erhofften wir uns weitere Einblicke in die biochemischen Funktionen des Avidin-Biotin-Komplexes.

Verwendet wurde als Enzymsystem zur Synthese höherer Fettsäuren aus C^{14}-markiertem Na-Acetat gemäß der von von Brand und Helmreich modifizierten Methode nach Brady und Gurin entsprechend aufgearbeitete Taubenleber.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1.) Steigende Konzentrationen von chem. reinem Avidin (0,001 - 1 mg) hemmen die Fettsäuresynthese bis maximal 11 %. Bei Zugabe von Avidin im Eiklar fanden sich ähnliche Ergebnisse. Der ATP-Ferment-Test mit gleichen Gaben Avidin im Eiklar und Avidin in Reinsubstanz (0,26 mg) brachte das Resultat, daß bei stärkerer Hemmung der Fettsäuresynthese durch reines Avidin (2320 Impulse/Min) größere ATP-Mengen (33 Gamma/ml Ansatz) noch im Ansatz verbleiben, während es bei geringerer Hemmung durch Avidin im Eiklar (3220 Impulse/Min) nur kleinere ATP-Mengen im Ansatz verbleiben (15 Gamma/ml Ansatz).

2.) ATP und CoA-Zugaben und CO_2-Begasung förderten stets die Ausbeute an synthetisierten radioaktivmarkierten Fettsäuren der durch Avidingabe gehemmten Fettsäuresynthese.

3.) Die Cholesterinsynthese des Fermentsystems aus Taubenleber fällt bei stärkeren Avidinkonzentrationen (0,02 - 1 mg) sowohl beim reinen Avidin als auch beim Avidin im Eiklar bis zu 24 % der Cholesterinsynthese des Ausgangshomogenates ab.

4.) Ein gravierender Einfluß von Biotin auf die Fettsäuresynthese läßt sich auch durch breitangelegte Versuche (Konzentrationen von 0,0001 - 25 Gamma Biotin) nicht erkennen. Der ATP-Ferment-Test zeigt den vermehrten ATP-Verbrauch bei Biotinzugabe (Sup + Biotin 9 Gamma ATP/ml Ansatz) gegenüber dem ATP-Verbrauch des Ausgangshomogenates ohne Zusatz ("Sup") mit 36 Gamma ATP/ml Ansatz.

5.) Zugabe von ATP und CoA und CO_2-Begasung fördert jeweils die durch Biotin nur unwesentlich beeinflußte Fettsäuresynthese über die um etwa 100 % gehaltenen Werte des Ausgangshomogenates hinaus. Die stärksten Förderungen lassen sich dabei mit CO_2 und ATP erzielen (142 % und 143 %).

6.) Nur bei einer bestimmten Konzentration von 10 Gamma Biotin gelang ein überzeugender Effekt in den Avidin-Biotin-Kombinations-Versuchen. Es ließ sich dabei die durch Avidin auf 24 % gehemmte Fettsäuresynthese auf 140 % nach Biotingabe fördern.

Die Ergebnisse wurden diskutiert. Hierbei erwies sich der Vorgang der Carboxylierung im Ablauf der Fettsäuresynthese vom Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, der als Coferment neben CO_2 und ATP Biotin benötigt, in erster Linie als Kristallisationspunkt der Ergebnis - Interpretation.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Münchner Medizinischen Poliklinik unter der Leitung von Professor Dr. W. SEITZ in dessen Isotopenlabor unter der Leitung von Dr. phil. et med. Vera Freifrau von BRAND ausgeführt.

Mein besonderer Dank für das Anerbieten dieses Themas sowie für fördernde und anregende Diskussion gilt in erster Linie Herm Professor Dr. W. SEITZ.

Im gleichen Atemzuge darf ich meiner "Doktor-" Mutter, Dr. phil. et med. Vera Freifrau von BRAND, von Herzen danken, die durch ihre unermüdliche Betreuung entscheidenden Verdienst an dieser Arbeit hat.

Die Experimente konnten nur durch die sorgfältige und liebevolle Mithilfe von Fräulein Ingrid THÖRING, der chemisch-technischen Assistentin, gedeihen.

Fräulein Barbara von KUTZSCHENBACH und später dann Fräulein Heide WILDE, die medizinisch-technischen Assistentinnen, unterstützten mich mit großem Fleiß während der ATP-Teste.

Ihnen allen fühle ich mich zu großer Dankbarkeit verpflichtet.

LITERATUR

1. Leuthardt, F. Lehrbuch der Physiolog. Chemie, Berlin (1959)

2. Karlson, P. Lehrbuch der Biochemie (1961)

3. Lipmann, F., Kaplan, N.O. J. of Biol. Chem. 162, 743 (1946)

4. Novelli, G.D. Federat. Proc. 12, 675 (1953)

5. Lynen, F.,Reichert,E. Angew. Chemie 63, 47 (1951)

6. Lynen, F., Knappe, J., Lorch, G., Jütting, G., Ringelmann, E. Die biochemische Funktion des Biotins. Sitzungsbericht der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse der Bayr. Akademie d. Wissenschaften (Febr. 1959)

7. Boas, M.A. Biochem. J. 21, 712 (1927)

8. György, P. Übersicht in W.H.Sebrell jr. und R.S.Harris: The Vitamins Academie Press, New York, 527, Bd.1 (1954)

9. Kögl, F. Berichte dtsch. chem. Ges. A. 16 (1935)

10. Kögl, F., Hoppe-Seylers, Tönnis, B. Z. physiol. Chemie 242, 43 (1936)

11. Melville, D.B., Mayer, A.W., Hoffmann, K., Du Vigneaud, V. J. biol. Chemistry 146, 487 (1942)

12. Harris, S.A.,Wolf, D.E., Mozingo, R., Folkers, K. Science (Washington) 97, 447 (1943)

13. Harris, S.A., Wolf, D.E., Mozingo, R., Arth, G.E., Anderson, R.C. Easton, N.R., Folkers, K. J. Amer. chem. Soc. 67, 2096 (1945)

14. Stepp, W., Kühnau, J., Schröder, H. Die Vitamine und ihre klinische Anwendung Stuttgart (1952)

15. Jadassohn, J. Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten Band VI und XIII Berlin (1927 und 1932)

16. Jadassohn, J. Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten Ergänzungswerk Band V/1 Berlin

17. Lardy, H.A., Potter, R.L., Elvehjem, C.H.
J. biol. Chem. 169, 451 (1947)

18. Shive, W., Rogers, L.L.
J. biol. Chem. 169, 453 (1947)

19. Lardy, H.A., Potter, R.L., Burris, R.H.
J. biol. Chem. 179, 721 (1949)

20. Ochoa, S. et alt. J. biol. Chem. 174, 435 (1948)

21. Bettex, M. Helv. physiol. Acta 15, C 54 (1957)

22. Plaut, Lardy, H.A. J. biol. Chem. 192, 435 (1951)

23. Lardy, H.A., Peanasky, R.
Physiol. Rev. 33, 564 (1953)

24. Mac Leod, P.R., Grisolia, S., Cohen, P.P., Lardy, H.A.
J. biol. Chem. 180, 1003 (1949)

25. Lardy, H.A., Feldott, G.
J. biol. Chem. 192, 447 (1951)

26. Mac Leod, P.R., Lardy, H.A.
J. biol. Chem. 179, 733 (1949)

27. Moat, A.G., Wilkins jr., C.N., Friedmann, H.
J. biol. Chem. 223, 985 (1956)

28. György, P., Kuhn, R., Wagner-Jauregg, Th.
Naturwissenschaften 21, 560 (1933)

29. Knappe, J. Inauguraldissertation Universität München (1957)

30. Wakil, S.J., Titchener, E.B., Gibson, D.M.
Biochem. biophysical Acta 29, 225 (1958)

31. Fraenkel-Conrat Arch. Biochem. Biophys. 39, 80 (1952)

32. von Brand, V., Seitz, W.
Klinische Wochenschrift 36.Jahrg. 2.Heft, S. 87/88 (1958)

33. Brady, R.O., Gurin, S.
J. biol. Chem. 199, 421 (1952)

34. von Brand, V., Helmreich, E.
Biochem. Z. 328, 146 (1956)

35. Flavin, M., Castro-Menoza, H., Ochoa, S.
Biochem. biophysica Acta 20, 591 (1956)

36. Tietz, A., Ochoa, S.
J. biol. Chem. 234, 1394 (1959)

37. Knappe, J. Dissertation Universität München (1957)

38. von Stetten, D. Dissertation Universität München (1960)

39. Lang, K. Der Intermediärstoffwechsel (Berlin 1959)

40. Heilmeyer, L. Lehrbuch der Inneren Medizin Berlin (1955)

41. Sturm, A. in Heilmeyer:
Lehrbuch der path. Physiologie S. 488, Stuttgart (1955)

42. Frantz jr., J.D., Schneider, H.S., Hinkelmann, B.
J. biol. Chem. 206, 465 (1954)

43. Sund, Chr. Inauguraldissertation Universität München (1960)

44. Morbach, H.J. Inauguraldissertation Universität München (1959)

LEBENSLAUF

Am 11. Dezember 1934 wurde ich, Christian-Werner Villinger, als Sohn des ärztlichen Leiters der von Bodelschwinghschen Anstalten Bethel bei Bielefeld, des außerordentlichen Professors für Psychiatrie und Neurologie Dr. med. Werner Villinger und seiner Frau Louise geborene Bösch in Bielefeld geboren.

Über die Stationen meines Vaters, Ordinariate für das Fach der Psychiatrie und Neurologie: 1939 Breslau und nach der Flucht 1945 Tübingen, kam ich Mitte 1946 nach Marburg, wo ich im März 1955 an dem dortigen Städtischen Realgymnasium mein Abitur und an der Alma mater Philippina im Februar 1959 das Physikum machte. Mein drittes vorklinisches Semester verbrachte ich als Europa-Kollegiate in Hamburg. Meine klinischen Semester hörte ich dann alle an der hiesigen Münchner Ludwig-Maximilians-Universität.